Veränderungen der Proteinzusammensetzung im Liquor von psychiatrischen Patienten Analysiert durch zweidimensionale Elektrophorese

Karl-Heinz v. Hoch

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0065

Aus der Psychiatrischen Klinik der Universität München
Vorstand Prof. Dr. H. Hippius

VERÄNDERUNGEN DER PROTEINZUSAMMENSETZUNG IM LIQUOR VON PSYCHIATRISCHEN PATIENTEN ANALYSIERT DURCH ZWEIDIMENSIONALE ELEKTROPHORESE

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl-Heinz v. Hoch
aus
Temeschburg
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Ackenheil
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Hippius
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. D. B. Wildenauer
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.1987

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	**Einleitung**	**1**
B.	**Ziel und Zweck der Arbeit**	**6**
C.	**Experimenteller Teil**	**7**
C.1.	Geräte und Material	7
1.1	Geräte	7
1.2	Material	7
C.2.	Präparation der Proben für die zweidimensionale Gel-Elektorphorese	8
2.1	Puffer und Lösungen	8
2.2	Methode der Lymphozytentrennung	9
2.3	Liquor-Aufbereitung	11
2.3.1	Vakuumkonzentrierung	11
2.3.2	Filtrationskonzentrierung	11
C.3.	Proteingehalt	11
C.4.	Die zweidimensionale Gel-Elektrophorese nach O'Farrell	12
4.1	Herstellung der Gele	12
4.1.1	Gele der 1. Dimension - isoelektrische Fokusierung	12
4.1.2	Gele der 2. Dimension - SDS-PAGE	13
4.1.2.1	Trenngele	13
4.1.2.2	Sammelgele	14

4.2 Versuchsbedingungen bei der Durchführung der isoelektrischen Fokusierung (1. Dimension) 14
4.3 Äquilibrieren 15
4.4 Bedingungen für die Durchführung der SDS-PAGE (2. Dimension) 16

C.5. Die Silberfärbung der Acrylamid-Gele 18

5.1 Fixieren der Gele 18
5.2 Waschen 18
5.3 Imprägnieren 19
5.4 Waschen 19
5.5 Silberimprägnierung 20
5.6 Waschen 20
5.7 Entwickeln 20
5.8 Waschen 20
5.9 Stoppen des Färbevorgangs 21
5.10 Waschen 21
5.11 Aufbewahren 21
5.12 Trocknen der Gele 21
5.13 Übersicht zur Silberfärbung 22

D. Ergebnisse und Diskussion 23

D.1. Prinzip der Methode 23
1.1 Isoelektrische Fokusierung - 1. Dimension 23
1.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) - 2. Dimension 25

D.2. Ausarbeitung der Elektrophoresebedingungen und Diskussion der Methode 27

2.1 Isoelektrische Fokusierung 1. Dimension 27

a) Proteinmenge

b) Spannungs-Zeitverlauf beim isoelektrischen Fokusieren

c) Äquilibrieren

2.2 SDS-PAGE - 2. Dimension 29

a) Einfluß der Agarose und des ß-Mercaptoäthanols

b) Sammelgel

c) Trenngel

d) Spannung-Stromstärke-Zeit

2.3 Die Silberfärbemethode 32

D.3. Veränderungen der Proteinzusammensetzung im Liquor cerebrospinalis von schizophrenen Patienten 33

D.4. Ergebnisse aus den Versuchen 40

D.5. Zusammenfassung 46

E. Literaturverzeichnis

F. Lebenslauf

ABKÜRZUNGEN

CSF	Liquor cerebrospinalis
ZNS	Zentralnervensystem
2DE	Zweidimensionale Elektrophorese
IP	Isoelektrischer Punkt
IF	Isoelektrische Fokusierung = die erste Dimension
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacryl- amidgel Elektrophorese = die zweite Dimension
Tris HCl	Trishydroxymethylaminomethan Hydrochlorid
TEMED	Tetramethyläthylendiamin

A EINLEITUNG

Die Schizophrenie ist eine Erkrankung der Gesamtpersönlichkeit, sie betrifft den zentralen Bereich des "Ich" und hat eine veränderte Erlebnisstruktur zur Folge.
1911 prägte BLEULER (1) die heute gültige Bezeichnung - Schizophrenie - ausgehend davon, daß die elementärsten Störungen in einer mangelhaften Einheit, einer Zersplitterung und Aufspaltung des Denkens, Fühlens und Wollens liegen. Seine Definition lautet: Mit dem Namen Dementia praecox oder "Gruppe der Schizophrenien" bezeichnen wir eine Psychosengruppe, die bald chronisch, bald in Schüben verläuft, in jedem Stadium haltmachen kann, aber wohl keine volle Restitutio ad integrum erlaubt.
Die Schizophrenie ist eine der häufigsten Psychosen. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit (life-time Risiko) für die Durchschnittsbevölkerung (soweit sie das 40. Lebensjahr erreicht hat) liegt bei ca. 1 %. Sie ist in allen Rassen und Kulturen der Erde in anscheinend gleicher Häufigkeit vorhanden. Männer und Frauen sind in gleichem Maße davon betroffen.

Nach klinischen Kriterien wird die Vielfalt der schizophrenen Symptomatik in vier Krankheitstypen geordnet:
- paranoid-halluzinatorische Form
- katatone Schizophrenie
- hebephrene Schizophrenie
- Schizophrenia simplex

Diese Unterteilung des groben Krankheitsbereiches der Schizophrenie ist auch heute noch äußerst unbefriedigend. Die Feststellung BLEULERS, daß man innerhalb dieser Gruppen keine natürlichen Grenzen kennt (was man bisher für die Grenze ausgab, sind Grenzen von Zustandsbildern, nicht von Krankheitseinheiten) ist auch heute noch gültig. Anstatt nur von den Syndromen und Verlaufsformen auszugehen liegt es im Interesse der heutigen Psychiatrie nach den einzelnen Entstehungsbedingungen und nachweisbaren Faktoren zu fragen.
An die Kette der schon seit über 40 Jahren dauernden Bemühungen einer chemisch-physikalischen Beweisführung von meßbaren Veränderungen innerhalb dieser Zustandsbilder schließt auch diese Arbeit an.
Das menschliche Gehirn ist relativ unzugänglich für präzise biochemische Analysen. Da aber der Liquor cerebrospinalis (CSF) mit dem extrazellulären Gehirnraum in Kontakt steht, können Veränderungen im Metabolismus der Hirnzellen sich in einer veränderten Zusammensetzung des CSF wiederspiegeln (2,3).

Schon vor 1942 ergaben Studien großer Kollektive von Patienten Anomalien des Proteingehalts im CSF bei Schizophrenen (4). So wurde erhöhtes Gesamtprotein und γ-globulin gefunden (6), sowie in hohem Ausmaß ungewöhnliche Immunglobuline (5). Andere wieder berichteten über verminderte Immunglobulinmengen im CSF Schizophrener (7) und wieder andere fanden keine CSF Anomalien (8). Es wurde über erhöhtes IgM gegen Cytomegalievirus im CSF berichtet (9) während andere Forscher kein IgM anti-Cytomegalievirus fanden (10).

Ebenso haben neuere Studien mit Nachdruck auch die Uneinheitlichkeit der Resultate solcher Arbeiten betont in denen von "individuellen für die Schizophrenie spezifischen Proteine" die Rede ist (11,12,13). Veränderungen in Protein- bzw. IgG-Gehalt oder -Zusammensetzung sind im Wesentlichen auf zwei Ursachen zurückzuführen, entweder auf eine Störung der Blut/Hirnschranke, die damit durchlässig auch für höhermolekulare Proteine werden kann, oder auf eine Neubildung von Proteinen bzw. IgG im Liquorraum wie sie z.B. von der "intrathekalen" oder "autochthonen" IgG-Bildung bei multipler Sklerose bekannt ist. Als ein gutes Mittel zur Bestimmung einer Funktionsstörung der Blut-Hirnschranke haben sich der Albumin und IgG-Index erwiesen. Der IgG-Index kann auch über ZNS-Anomalien mit "intrathekaler" IgG Produktion Aufschluß geben. Bei erhöhtem IgG-Index sind oft oligoklonale IgG-Banden die spezifisch für Erkrankungen des Gehirns sind mittels Elektrophorese nachweisbar. Bei der Interpretation der mit diesen Methoden erhaltenen Daten im Hinblick auf Ursachen der Schizophrenie ist jedoch äußerste Vorsicht erforderlich (14). Diese Methoden sind jedoch sehr wertvoll für den Ausschluß von organisch bedingten Psychosen.

Schon vor 40 Jahren wurden Untersuchungen des CSF mittels Elektrophorese durchgeführt, aber damals wurden noch sehr große Liquormengen benötigt. Später haben KERENYI und GALLYAS (1972) eine Silberfärbemethode für Agarelektrophoresegele ausgearbeitet welche sehr empfindlich ist und mit geringerer Menge Liquor auskommt.

Im Jahre 1975 entwickelte O'FARRELL (15) die Methode der 2D-Elektrophorese fußend auf vorhergehenden Arbeiten von DAVIS (24), ORNSTEIN (23) und WEBER und OSBORN (22) deren Arbeiten zur Molekulargewichtsbestimmung mittels Acrylamidgelelektrophorese die außerordentliche Genauigkeit der Methode unterstrich, sowie auf Arbeiten von LAEMMLI (21) und STUDIER (25) welche zur Auftrennung der Bakteriophagenproteine die SDS-PAGE benützten. O'FARRELL beschäftigte sich mit der Auftrennung von Escherichia coli Proteinen und zeigte, daß die Auflösungsmöglichkeit dieser Methode in der ersten Dimension, im sogenannten "Isoelektrischen Fokusieren" ca. 70 Proteine und in der anschließende zweiten Dimension in der SDS-PAGE auf Gradientengelen bis zu 100 Proteine also theoretisch insgesamt 7000 Komponenten beträgt. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP) aufgetrennt werden. Hier wird Elektrophorese in einem Röhrchen mit Polyacrylamidgel, in welchem ein linearer pH-Gradient aufgebaut wurde, durchgeführt. Dabei wandern Proteine mit annähernd gleichem IP aber meist unterschiedlichem Molekulargewicht an die gleiche Stelle im Gel. Anschließend, in der zweiten Dimension, werden die Proteine mittels SDS in negativ-geladene Komplexe verwandelt und in einem Polyacrylamidgel, dessen Maschenweite gradientenartig oder gleichmäßig verteilt sein kann, nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

In den Jahren 1979-1982 wurde von MERRIL (16), sowie von OAKLEY (17) die Silberfärbemethode für die 2D-Elektrophorese adaptiert. Diese entspricht im Wesentlichen dem Prinzip der fotographischen Entwicklung und ermöglicht es, mit geringsten Mengen von Liquor (10-

20 ul) ausgezeichnete Informationen über die Proteinzusammensetzung zu erhalten.
Es folgten Studien in welchen CSF und Serumproteine miteinander verglichen wurden (18). Andere Untersuchungen vergleichen die Zusammensetzung der Proteine und Immunglobuline in verschiedenen Krankheiten wie Multiple-Sklerose, Morbus Parkinson, Herpes-simplex-encephalitis u.a. mit denen eines Normalprobandenkollektives. Dabei wurden Veränderungen qualitativer und quantitativer Art gefunden, ohne jedoch die gefundenen Veränderungen interpretieren zu können.

B ZIEL UND ZWECK DER ARBEIT

Die biochemische Analyse von Veränderungen bei psychiatrischen Erkrankungen könnte von größter Bedeutung für Diagnose, aber auch für die Erforschung der Pathogenese der entsprechenden Krankheit sein.
Aufbauend auf erste Arbeiten über qualitative und quantitative Veränderungen im Proteingehalt des Liquors von schizophrenen Patienten (20, 26) waren die folgenden Aufgaben gestellt:

1) Erarbeiten des Verfahrens der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der "Silberfärbung" zum Nachweis der Proteine.
2) Optimieren der Parameter für die Auftrennung der Liquorproteine.
3) Vergleich des Proteinmusters des Liquors von psychiatrischen mit dem von neurologischen Kontrollen.
4) Auswertung der Befunde in Bezug auf Krankheit bezw. Krankheitsuntergruppen, Behandlung mit Psychopharmaka, sowie auf Alter und Geschlecht der Patienten.

C EXPERIMENTELLER TEIL

C1. Geräte und Material

1.1 Geräte:

- Zentrifugen: Beckmann Kühlzentrifuge I2-21/Rotor I.A.-20.1 Hettich Rotanta/b
  Microfuge der Firma Eppendorf

- Netzgerät Bio-Rad Modell 3000/300

- Geltrockner Bio-Rad Modell 483

- Vakuumverdampfung mittels Speed Vac Zentrifuge

- Apparatur für Isoelektrische Fokussierung
  Fa. For WTW-Weilheim

- Gelapparatur nach Studier (25)

1.2 Material:

- Einweg-Mikrokonzentrator: AMICON Centricon 10
- Harnstoff mind. 99,5 %; Agarose-L (Elektroendosmose Mr: 0,02); Ampholine pH 5-7 und pH 3,5-10; (LKB Bromma)
- TRIZMA-BASE: Tris (hydroxymethyl) aminomethan von SIGMA-Chemical Company.
- Akrylamid und SDS (Natriumdodecylsulfat) zur Elektrophorese von Bio-Rad

- Agarose standard (Elektroendosmose Mr: 0,13); Bis-methylenacrylamid, TEMED (Tetramethyl-äthylendiamin), Ammoniumpersulfat (SERVA Feinbiochemica Heidelberg).

Alle anderen Chemikalien wie Silbernitrat, Glycin, Natriumthiosulfat, ß-Mercaptoethanol, Natriumcarbonat, Glycerin, Formaldehyd waren in pro analysi Qualität von Fa. Merck.
Methanol, Ethanol (mit Petrolether vergällt) für Laboruntersuchungen, Essigsäure (99-100 %) reinst.

C2. Präparation der Proben für die zweidimensionale Gel-Elektrophorese

2.1 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung der im folgenden Test angegebenen Lösungen ist:

A. Lysis buffer: 9,5 M Harnstoff; 2 % (W/V) Nonidet NP-40; 2 % Ampholine (davon 1,6 % pH 5-7 und 0,4 % pH 3,5-10); 5 % Mercaptoethanol. Dieser Puffer wurde bei -20°C aufbewahrt.
B. Sonicationsbuffer: 0,01 M Tris/HCl (pH=7,4); 1mM $MgCl_2$ 50 ug/ml Pankreas RNA-se.
C. DNA-se Lösung: 1 mg Pankreas DNA-se in 1 ml 0,01 M Tris HCl (pH=7,4) 1mM $MgCl_2$.
D. Akrylamidlösung für die Gele der 1. Dimension: 28,38 % (W/V) Akrylamid und 1,62 % (W/V) Bisakrylamid.
E. Stock Nonidet P-40 Lösung: 10 % (W/V) NP-40 in H_2O
F. Ampholine: wurden als 40 % Lösungen geliefert und in dieser Form verwendet.

G. Ammoniumpersulfat: als 10 % (W/V) Lösung (alle 14 Tage neu ansetzen)

H. Gel overlay-Lösung: 8 M Harnstofflösung in H_2O (in 1 ml Portionen einfrieren).

I. Anoden Elektrolyt Lösung 1. Dimension: 0,01 M H_3PO_4 in H_2O

J. Kathoden Elektrolyt Lösung 1. Dimension: 0,02 M NaOH in entgastem H_2O

K. Sample overlay-Lösung: 9 M Harnstoff mit 1 % Ampholine (0,8 % pH = 5-7 und 0,2 % pH = 3,5-10) in 1 ml Portionen gefroren aufbewahrt.

L. Elektrodenpuffer für 2. Dimension: 0,025 M Tris Base; 0,192 M Glycin; 0,1 % SDS, pH = 8,3

M. Akrylamidlösung für die Gele der 2. Dimension: 30 % (W/V) Akrylamid und 0,8 % (W/V) Bisakrylamid.

N. Gel Puffer 5 x für die Gele der 2. Dimension: 1,875 M Tris; 0,5 % SDS; mit HCl auf pH 8,8 eingestellt.

O. Sammelgelpuffer für die 2. Dimension: 0,625 M Tris; 0,5 % SDS; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt.

P. Proben-Puffer (Sample-buffer): 10 % (W/V) Glycerin; 2,3 % SDS; (5 % (W/V) Mercaptoethanol) in 0,0625 M Tris HCl pH 6,8.

2.2 Methode der Lymphozytentrennung

Zu 50 ml frischem Blut wurden 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung, in welcher 60 mg EDTA und 2000 U Heparin ("Novo" oder "Seromed" ohne Konservierungsstoffe) gelöst waren, hinzugegeben. Das so vorbereitete Blut wurde in Polyaethylenröhrchen 10-15 Min. bei ca. 300 x g_{max} zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das

Plasma abgehoben und die zurückgebliebenen Blutzellen mit Hank'scher Pufferlösung im Verhältnis 1 Teil Zellen zu 3 Teile Puffer verdünnt.
Die Pufferlösung wurde bei jeder Präparation frisch bereitet. Sie besteht aus 9,86 g Hank's Salze + 0,35 g $NaHCO_3$ auf 1 l Wasser (pH=7,4-7,5).
Die Gradiententrennung mit Fikoll: 4 Volumenteile der oben erhaltenen Verdünnung wurden mit 3 Volumenteilen Fikoll überschichtet und 40 Min. bei 20°C (Kühlzentrifuge) und 400 x g_{max} zentrifugiert. Die Lymphozyten sammelten sich an der Trennschicht und wurden mit Pasteurpipetten abgehoben und in einem Zentrifugiergläschen mit 15 ml Hank'scher Pufferlösung gewaschen und erneut 10 Min. bei 150 x g_{max} zentrifugiert. Nun sammelten sich die Lymphozyten am Boden des Röhrchens, der Überstand wurde abgegossen und noch 3 mal mit Hank'scher Pufferlösung gewaschen und zentrifugiert (2 mal bei 150 x gmax und 1 mal bei 100 gmax). Die so erhaltenen Lymphozyten wurden mit Hank'scher Pufferlösung auf 1000 ul ergänzt. Davon wurden 20 ul auf 20 ml verdünnt und zur Zellzahlmessung verwendet. Der Rest von 980 ul wurde erneut bei 100 x gmax zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die verbliebenen Lymphozyten mit "Sonicationbuffer" auf 300 ul gebracht.
Unter Eiskühlung wurden die Lymphozyten mit einem Ultraschall-Stabgenerator (3.8 Sek.) behandelt. Anschließend wurden 20 ul DNA-se (1 mg/ml) hinzugefügt, 5 Min. auf Eis gehalten und mit 320 ul Lysisbuffer und 173 mg Harnstoff (9M) vermengt und eingefroren.

2.3 Liquor-Aufbereitung

2.3.1 Vakuumkonzentrierung

Die Liquorproben (1 ml) wurden in einer Vakuumzentrifuge (bis zur Trockene) eingeengt und anschließend in 200 ul Lysisbuffer (A) gelöst und eingefroren.

2.3.2 Filtrationskonzentrierung

Der Liquor wurde bei 100 x g_{max} 10 Min. zentrifugiert um evtl. Zellreste zu entfernen. Anschließend wurde 1 ml in einem Mikrokonzentrator "Centricon 10" in einer Kühlzentrifuge bei 8000 Rpm (Beckmann-Rotor Ia-201) 40 Min. und 8-10°C zentrifugiert. Dieser Mikrokonzentratoreinsatz hält alle Makromoleküle mit einem Molekulargewicht über 10 000 Dalton zurück. Das Retentat wird durch Umdrehen des Mikrokonzentrators und erneutem 30 Min. Zentrifugieren bei 8000 Rpm in einem Behälter aufgefangen.
Anschließend wurde das Retentatvolumen bestimmt und Harnstoff einer 9M Konzentration entsprechend hinzugegeben. Nach Zugabe von 150-200 ul Lysis-Buffer (A) wurde die Präparation eingefroren.

C 3. Proteingehalt

Der Proteingehalt wurde mit der Cu-Folin Methode nach RIEDER (27) bestimmt.

C 4. Die zweidimensionale Gel-Elektrophorese nach O'FARRELL

4.1 Herstellung der Gele

4.1.1 Gele der 1. Dimension (isoelektrische Fokussierung)

Die Gele der 1. Dimension wurden in Glasröhrchen (130x2 mm) welche am Boden mit Parafilm verschlossen sind, (blasenfrei) gegossen. Die Gellänge beträgt ca. 125 mm und das entsprechende Gelvolumen 0,4 ml. Die Acrylamidendkonzentration im Gel ist 4 %. Die Arbeitsschritte im einzelnen waren:

1) Herstellung von 10 ml Gelmixtur bestehend aus: 5,5 g Harnstoff; 1,3 ml Acrylamidlösung (D); 2,0 ml NP-40 Lösung (E); 1,97 ml tridestilliertes Wasser; 0,4 ml Ampholine pH 5-7; 0,1 ml Ampholine pH 3,5-10.
2) Rühren bis der Harnstoff vollständig gelöst und Zugabe von 10 ul 10 % Ammoniumpersulfatlösung (G). Das Gemisch 1 Min. lang entgasen. Anschließend sofort 7 ul TEMED hinzugeben.
3) Die Glasröhrchen wurden unter Vermeidung von Luftbläschenbildung mit einer langen Kanüle aufgefüllt (bis ca. 5 mm unter dem oberen Rand)
4) Die Gellösung wurde vorsichtig mit Gel overlay-lösung (H) überschichtet.
5) Nach 1-2 Std: Entfernen der Gel-overlay-Lösung von dem schon polymerisierten Inhalt des Röhrchens und erneutes Überschichten mit 20 ul Lysis-buffer (A), diesen mit wenig H_2O.
6) 1-2 Stunden stehen lassen.
7) Entfernen des Parafilmes und der Schicht aus Lysis-buffer und H_2O.
   Die Röhrchen wurden anschließend in die Elektrophoresekammer eingesetzt und erneut mit 20 ul frischem

Lysis-buffer (A) überschichtet. Das restliche Volumen des Röhrchens und das obere Reservoir der Elektrophoresekammer wurden mit 0,02 M NaOH Lösung aufgefüllt.

8)Das untere Reservoir wurde mit 0,01 M H_3PO_4 gefüllt.

9) Die Vorelektrophorese wurde von Minus nach Plus unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1/4 Std. - 200 V.
1/2 Std. - 300 V.
1/2 Std. - 400 V.

10) Danach wurde die obere Kammer entleert, Lysisbuffer und NaOH von der Geloberfläche entfernt und das Gel mit den, wie oben beschrieben, vorbehandelten Proben beladen.

4.1.2 Gele der 2. Dimension

4.1.2.1 Trenngele

Für Lymphozytenpräparationen wurde mit Gradientengele, die in einem Zweikammer-Standard-Gradientenmischer aus 8 % und 15 %-igen Acrylamidlösungen gemischt wurden, gearbeitet. Für die CSF-Proteine eignete sich ein homogenes 10 %-iges Acrylamidgel.
Aus einer Acrylamidstammlösung (M) wurde durch Mischen mit 5 x Gel Puffer (N) und Wasser die erwünschte Konzentration eingestellt. Die Endkonzentration des Trenngels war:
0,375 M Tris HCl, (pH=8,8 und 0,1 % SDS). Dann wurde Temed (0,03 %) zugesetzt und mit Ammoniumpersulfat (0,03 %) die Polymerisation gestartet. Das flüssige Trenngel wurde zwischen zwei abgedichtete Glasplatten

(1 mm dicke Dichtungen) gegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Die Polymerisation bei Raumtemperatur fand innerhalb 1 1/2 - 2 Stunden statt. Das erhaltene Gel hatte folgende Maße: 145 x 90 mm.

4.1.2.2 Sammelgel

Das Sammelgel enthielt 5 % Acrylamid und wurde aus der gleichen Acrylamidstammlösung (M) wie die Trenngele, durch Mischen mit Sammelgelpuffer (O) und Wasser hergestellt. Die Endkonzentrationen des Sammelgels waren 0,125 M Tris-HCl (pH = 6,8); 0,1 % SDS; 0,03 % Temed und 0,03 % Ammoniumpersulfat.

Das flüssige Sammelgel wurde über das polymerisierte und vom überschichteten Wasser getrocknete Trenngel gegeben und erneut mit Wasser überschichtet. Die Polymerisation bei Raumtemperatur war innerhalb 1 Stunde beendet. Die Breite des Sammelgels war 15-20 mm.

4.2 Versuchsbedingungen für die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension)

Von Bedeutung für die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung ist das Konstanthalten der Parameter bei der Durchführung der einzelnen Schritte. So sollen die Glasröhrchen wie auch die Gele für alle Proben gleich lang sein um die Elektropherogramme mit einander vergleichen zu können. Ferner sollen die aufgetragene Gesamt-Proteinmenge und der Spannungszeitablauf der gleiche sein.

In unseren Versuchsreihen wurden folgende Bedingungen konstant gehalten:

- Die Glasröhrchen der 1. Dimension hatten eine Gesamtlänge von 13 cm.
- Die Gellänge wurde auf 12,5 cm eingestellt.
- Vorfokussiert wurde

  1/4 Std. bei 200 V.
  1/2 Std. bei 300 V.
  1/2 Std. bei 400 V.
- Die aufgetragene Proteinmenge war 15 ug.
- Der Spannungs-Zeitablauf war wie folgt:

  16 Std. bei 400 V.
  1 Std. bei 1000 V.
  10 Min. bei 2000 V.

Die wie in C 2.1 und C 2.2 aufbereiteten Proben wurden mit einer ul-Spritze, der Menge von 15 ug entsprechend, auf die wie in C 4.1.1 beschriebenen vorfokussierten Gele aufgetragen. Die Proben auf dem Gel wurden mit 10 ul Sample overlay-Lösung (K) überschichtet und die Elektrophoresekammer (Kathode-) mit frischer 0,02 NaOH Lösung aufgefüllt. Dabei wurden Luftbläscheneinschlüsse über den Proben wie auch am anodischen Ende der Gelröhrchen beseitigt.
Die Elektrophorese wurde dann nach dem oben genannten Spannungs-Zeit-Diagramm durchgeführt.

4.3 Äquilibrieren

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurde der Acrylamidzylinder der ersten Dimension unter Druck mit Wasser aus den Glasröhrchen in ca. 5 ml "Samplebuffer" (P) gepreßt. Darin wurden sie 1/2-1 Std. zum Äquilibrieren bei Raumtemperatur (unter mehrmaligem Schütteln) aufbewahrt und anschließend eingefroren.

Der Prozeß des Äquilibrierens kann zu jeder Zeit unterbrochen und die Probe eingefroren werden. Nach dem Auftauen kann das Äquilibrieren fortgesetzt werden. Eingefrorene Gele können bei -70°C unbegrenzte Zeit aufbewahrt werden ohne daß man eine Veränderung der Proteine befürchten muß.

4.4 Bedingungen für die Durchführung der SDS-PAGE (zweite Dimension)

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das überschichtete Wasser abgegossen und die Geloberfläche und Glasplatten getrocknet. Die Gelzylinder der 1. Dimension wurden mittels 1 %-iger Agaroselösung blasenfrei an das Sammelgel angeklebt.
Dies wird begünstigt, wenn die Glasplatten vorher mit Warmluft erwärmt wurden und das Schmelzen der Agarose, welche in eingefrorenem Zustand aufbewahrt wird, in einem Mikrowellenherd durchgeführt wird.
Die Gelzylinder der 1. Dimension wurden, nach dem Auftauen des zum Äquilibrieren verwendeten Sample-buffers (P), auf ein Stück Parafilm oder ein Kunststoffschäufelchen gebracht und von der Flüssigkeit befreit (durch Abtropfen bei geneigter Unterlage). Eine dünne Schicht geschmolzener Agarose wurde auf das Sammelgel gegossen und der Gelzylinder in diese eingebracht. Es war wichtig, daß dabei keine Luftbläschen eingeschlossen wurden, damit der kontinuierliche Übergang der Proteine von der 1. in die 2. Dimension gewährleistet war.
Nach dem Festwerden der Agarose nach ca. 5 Min. wurde die Teflondichtung an der Basis des Trenngels entfernt und die Glasplatten mit den Gelen in einer Apparatur nach Studier (25) befestigt. Darauf wurde Elektroden-

puffer (pH=8,3) der Zusammensetzung: 0,025 M Tris-HCl; 0,129 M Glycin 0,1 % SDS; in das Kathoden- und Anodenabteil gegossen, wobei darauf geachtet werden mußte, daß an der Gelbasis keine Luftblasen zwischen den Glasplatten eingeschlossen blieben. Falls dies nicht gelang, mußte mit einer 10 ml Spritze mit langer Kanüle ein Strahl Elektrodenpuffer auf die Luftblase gerichtet werden, um diese zu entfernen. Darauf wurde ca. 10 ul einer 0,1 % Bromphenolblaulösung zur oberen Elektrophoresekammer als Farbindikator zum Sichtbarmachen der Wanderungsfront, hinzugegeben. Die Stromstärke von 20 mA pro Gel wurde verwendet und konstant gehalten. 15 Min. nach Austritt des Farbindikators aus dem Gel in den Anodenpuffer wurde die Stromzufuhr abgeschaltet. Die Spannung zu Beginn ca. 70-75 V steigt auf 210-230 V und die Leistung von 1 W auf 4-5 W am Ende der Elektrophorese. Anschließend wurden die Glasplatten vorsichtig dem Elektrophoresegerät entnommen, die seitlichen Teflondichtungen entfernt und eine der Glasplatten vom Gel abgehoben. Das Sammelgel mit dem Gelzylinder der 1. Dimension wurde verworfen und das Trenngel zum Fixieren in eine Lösung von 50 % MeOH + 12 % HOAc gebracht.

C 5. Die Silberfärbung der Acrylamid-Gele

Die Anfärbung von Proteinbanden in Acrylamidgelen mit Silberionen wird bei dem Verfahren von MERRILL et al. (16) in einer neutralen Silbernitratlösung durchgeführt, die anschließende Entwicklung im basischen (Natriumcarbonat) Milieu.
Der Vorteil dieser Methode ist die gegenüber anderen Färbemethoden wesentlich höhere Empfindlichkeit, führte aber nur bei genauestem Einhalten der nachfolgend geschilderten Bedingungen zum erwünschten Erfolg.

5.1 Fixieren der Gele

Nach Beendigung der zweiten Dimension wurde das einzufärbende Gel in die 10-20-fache Menge (des Gelvolumens) Fixierlösung bestehend aus 50 % Methanol und 12 % Essigsäure, transferiert. Bei dieser und allen folgenden Phasen sollte der direkte Kontakt des Gels mit den Händen vermieden werden.
Das Gel wurde über Nacht (mindestens aber 2-3 Std.) in der Fixierlösung belassen (günstig wirkte sich leichtes Schütteln aus). Die kombinierte Alkohol-Säurefällung verhindert die Diffusion der aufgetrennten Proteine und entfernt Substanzen wie Glycin und Ampholine.

5.2 Waschen

Das Gel schrumpft unter der wasserentziehenden Wirkung der Fixierlösung auf ca. 70 % seiner anfänglichen Größe. Durch 3 x Waschen mit einer 30 % Äthanol Lösung wird der Wassergehalt des Gels langsam erhöht, um ein

evtl. Zerplatzen durch schockartiges Quellen des Gels bei der anschließenden Imprägnierung zu verhindern. Desgleichen wird die Anfärbegeschwindigkeit durch Spuren von Methanol und Essigsäure herabgesetzt, so daß quantitatives Entfernen wichtig ist. Deshalb soll die Waschflüssigkeit am besten mit einer Wasserstrahlpumpe quantitativ nach jedem Waschvorgang abgesaugt werden. Verlängerung des Waschvorgangs (welcher unter Schütteln stattfinden soll) wirkt sich positiv auf die Anfärbung aus (min. 3 x 30 Min.).

5.3 Imprägnieren

Durch kräftiges Schütteln (1 Min.) des Gels mit einer Lösung bestehend aus 300 ml H_2O + 200 ul 37 % Formalinlösung und 150 ul 1,73 M Na-Thiosulfat-Lösung, quillt das Gel in der hypotonen Lösung und nimmt Natriumthiosulfat auf. Dieses verhindert eine nicht proteingebundene Reduktion von Silberionen und damit die Anfärbung des Hintergrundes. Wichtig bei diesem Schritt ist die Dauer von 1 Min. die nicht überschritten werden sollte. Ebenso soll die Natriumthiosulfat Lösung nicht älter als eine Woche sein.

5.4 Waschen

Nach dem Absaugen der Imprägnierlösung wurde (3 x 1 Min.) unter kräftigem Schütteln mit Wasser (300 ml) gewaschen.

5.5 Silberimprägnierung

Das gewaschene Gel wurde 30 Min. unter leichter Bewegung in 300 ml 12 mM Silbernitrat Lösung und 200 ul 37 % Formalinlösung inkubiert.

5.6 Waschen

Nach dem Absaugen der Silbernitratlösung wurde zweimal 0,5 Min. mit 200 ml Wasser das überschüssige $AgNO_3$ ausgewaschen.

5.7 Entwickeln

Die Reduktion der proteingebundenen Silberionen wurde mit einer Lösung bestehend aus: 150 ml 0,57 M Natriumcarbonatlösung und 75 ul 37 % Formaldehyd und 1,5 ul Natriumthiosulfatlösung in zwei Schritten vorgenommen. Als erstes wird das Gel in 150 ml der Lösung bis zum Erscheinen der ersten Schatten kräftig geschüttelt. Anschließend wird die Reduktionslösung abgesaugt und neue nachgefüllt. Die Lösung sollte 20°C nicht überschreiten. Die Proteinflecken werden nach und nach dunkelbraun bis schwarz. Der Hintergrund des Gels muß klar bleiben.

5.8 Waschen

Es wurde 2 x 2 Min. mit ca. 300 ml Wasser gespült.

5.9 Stoppen des Färbevorganges

Mit 7 % Essigsäurelösung (2 x 10 Min. eisgekühlt) wurde der Färbevorgang durch Neutralisation des Natriumcarbonat gestoppt.

5.10 Waschen

Die Essigsäurereste wurden mit Wasser (2 x 20 Min.) unter Eiskühlung ausgewaschen.

5.11 Aufbewahren

Das Gel wurde in 30 % Methanol im Kühlschrank aufbewahrt.

5.12 Trocknen der Gele

Die 30 % Methanollösung wurde abgesaugt und durch 3 % Glycerinlösung ersetzt. Das Gel quillt dabei und nimmt Glycerin auf, welches das Geschmeidigbleiben des Gels nach dem Trocknen garantiert. Nach 20-30 Min. wurde das Gel aus der Glycerinlösung herausgenommen und zwischen zwei Cellophanfolien bei 80°C unter Wasserstrahlvakuum getrocknet.
Die getrockneten Gele waren transparent bis leicht gelblich. Die Proteinbanden hatten einen schwarzen, braunschwarzen bis grauen Farbton.

5.13 Übersicht zur Silberfärbung

1) Fixieren mit 5 % Methanol und 12 % Essigsäure	2-3 Std.
2) Waschen mit 30 % Äthanol	2x30 Min.
3) Imprägnieren mit 2,46 mM Formaldehyd 0,26 mM Natriumthiosulfat	genau1 Min.
4) Waschen mit deionisiertem Wasser	3x1 Min.
5) Silberimprägnieren mit 3,6 mM Silbernitrat und 2,46 mM Formaldehyd	30 Min.
6) Waschen mit deionisiertem Wasser	2x0,5 Min.
7) Entwickeln mit 0.57 M Natriumcarbonat und 0,92 mM Formaldehyd	bis zum Erscheinen der Proteinpunkte
8) Waschen mit deionisiertem Wasser	2x2 Min.
9) Stoppen des Färbevorgangs mit 7 % Essigsäure unter Eiskühlung	2x10 Min.
10) Waschen mit eisgekühltem, deionisiertem Wasser	2x20 Min.
11) Aufbewahren in 30 % Methanol	bei 5°C.
12) Trocknen der Gele	2 Std.

D Ergebnisse und Diskussion

D 1. Prinzip der Methode (Abb. 1)

1.1 Isoelektrische Fokusierung
(1. Dimension der 2D-Elektrophorese)

Bei diesem ersten Schritt der Proteinauftrennung wird die Immobilität des Proteins im elektrischen Feld beim Erreichen des isoelektrischen Punkte genutzt. In einem großmaschigen Acrylamidgel als Matrix (welches keinen Siebeffekt auf die Proteinmoleküle ausübt) wird mittels Ampholine ein linearer pH-Gradient aufgebaut. Entlang dieses Gradienten wandern die elektrisch geladenen Proteinmoleküle, bis sich an dem Ort der pH-Skala, welcher ihrem isoelektrischen Punkt entspricht ihre elektrische Ladung neutralisiert und ihre Beweglichkeit auf null sinkt.
Dies bedeutet, daß sich verschiedenartige Proteinmoleküle mit gleichem oder sehr nahe liegendem isoelektrischen Punkt nach Beendigung der 1. Dimension in einem schmalen Band "fokusiert" am gleichen Ort des Acrylamidgels befinden werden. Der pH-Gradient wurde im 4 % Polyacrylamidgel, welches in Glasröhrchen gegossen wurde, mittels Ampholine von pH 3,5 bis pH 10 aufgebaut (Abb. 1).

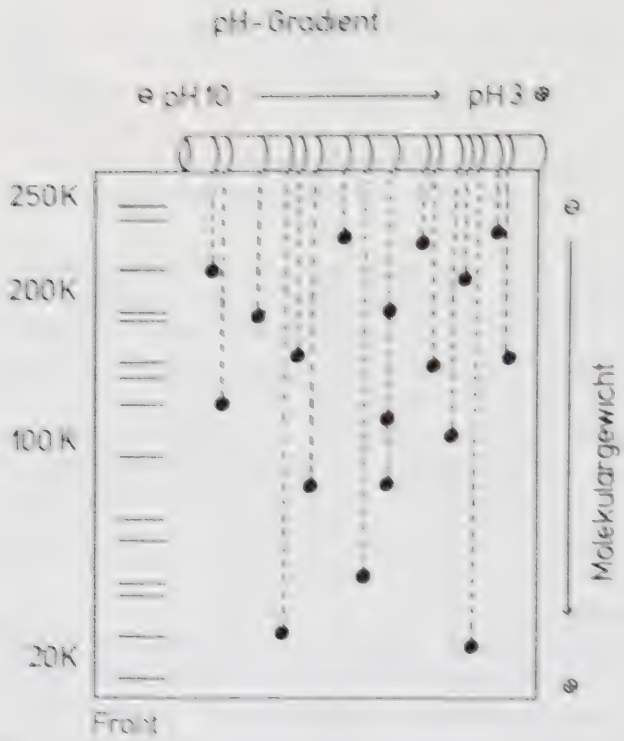

Abb. 1:

Prinzip der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese nach O'Farell:

1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung im pH-Gradient pH 10 pH 3 (schematisch: Röhrchen mit Proteinbanden)

2. Dimension: SDS Polyakrylamidgelelektrophorese nach steigendem Molekulargewicht (schematisch: Plattengel, links: Proteinbanden bei einfacher Plattengelelektrophorese)

1.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)
(2. Dimension der 2D-Elektrophorese)

Das Prinzip dieses zweiten Schrittes beruht darauf, daß die durch Anlagerung von Natriumdodecylsulfat (SDS) in negativ geladene Komplexe verwandelten Proteine mit Hilfe eines im elektrischen Feld wandernden Puffergradienten, bestehend aus amphoteren Glycinionen und Chloridionen, zunächst innerhalb eines großporigen Polyacrylamidgels (Sammelgel) in einer schmalen d.h. hochkonzentrierten Startzone gesammelt werden und anschließend innerhalb eines kleinporigen Gels (Trenngel) nach Molekülgröße fraktioniert werden. Das Trennungsvermögen dieser Methode beruht auf der Kombination von Konzentrierungs- und Molekularsiebeffekten.
Der pH-Wert des Sammelgels ist so gewählt, daß durch den Stromfluß die Chloridionen infolge höherer Beweglichkeit den Protein- und Glycinionen vorauswandern und eine Zone geringer Leitfähigkeit aber dementsprechend erhöhter Feldstärke hinter sich lassen. Diese erhöhte Feldstärke beschleunigt die Protein und Glycinionen derart, daß erstere hinter den Chloridionen mit gleicher Geschwindigkeit wandern und sich an der Front zwischen Chlorid und Glycinionen ansammeln. So erreichen die Proteine das kleinporige Trenngel maximal konzentriert in einer dünnen Startzone wo sie zwei Diskontinuitäten: die Änderung des pH-Wertes und der Porengröße antreffen. Der pH-Wert des Trenngels ist so gewählt, daß der Dissoziationsgrad der Glycinionen derart zunimmt, daß ihre Beweglichkeit der der Chloridionen gleicht. Die Glycinionen überholen jetzt die Proteine, wandern also dicht hinter den Chloridionen den Proteinen voraus, die nun durch das Trenngel nach

dem Molekularsiebeffekt und ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit getrennt werden. Auf diese Weise werden verschiedene Proteine mit ähnlichen isoelektrischen Punkten, welche sich in der ersten Dimension in der gleichen Bande befinden, in Einzelkomponenten aufgetrennt (Abb. 1). Die so aufgetrennten Proteine werden nach der Silberfärbemethode bei welcher schon Mengen von 0,5 ng Protein sichtbar gemacht werden können, nachgewiesen.

D 2. Ausarbeitung der Elektrophoresebedingungen und Diskussion der Methode

2.1 Isoelektrische Fokusierung - 1. Dimension

a) Proteinmenge:

Der Proteingehalt der aufgetragenen Proben wurde verändert: Anfänglich wurden ca. 38 ug Gesamtprotein pro Röhrchen aufgetragen. Mit dieser Menge wurden jedoch unklare Zeichnungen in der zweiten Dimension erhalten, was sich in einer Verschlierung der Proteinpunkte zu horizontalen Linien äußerte. Daraufhin wurde die aufgetragene Proteinmenge auf ca. 15 ug reduziert. Nachdem bei der isoelektrischen Fokusierung die Parameter Zeit und Spannung (siehe b) entsprechend geändert worden waren, konnte die Proteinmenge wieder bis auf 40 ug erhöht werden.

b) Spannungs-Zeit Verlauf beim Isoelektrischen Fokusieren

Die isoelektrische Fokusierung wurde so durchgeführt, daß das Produkt Spannung x Zeit den Wert 10.000 nicht überschreitet.
Folgende Varianten wurden geprüft:
a) 16 Std. bei 400 V
b) 16 Std. bei 400 V; 1 Std. bei 1000 V
c) 16 Std. bei 400 V; 1 Std. bei 1000 V; 10 Min. 2000 V

Die Qualität der Elektropherogramme war besser bei erhöhter Spannung, was der Verdichtung der Proteine bei erhöhter Feldstärke zuzuschreiben ist. Dementsprechend erschienen, selbst bei erhöhten Proteinmengen, in der 2. Dimension keine horizontalen Streifen, sondern klar

abgegrenzte Punkte und Flecken. Die Bedingungen nach c wurden als Standardbedingungen (siehe exp. Teil) verwendet.

c) Äquilibrieren

Die Gelzylinder der 1. Dimension wurden nach dem isoelektrischem Fokusieren unter Druck mittels einer mit Wasser gefüllten Spritze die über einen Gummischlauch mit den Glasröhrchen verbunden war, herausgepresst und in ca. 5 ml "Sample-buffer" (P) suspendiert. Der Einfluß der Äquilibrierungszeit im "Sample-buffer" auf die Proteinauftrennung in der 2. Dimension wurde überprüft. Bei einer 1/2 bis 1 Std. dauernden Äquilibrierung, unter mehrmaligem Schütteln, waren keinerlei negative Auswirkungen auf die Qualität der Elektropherogramme der 2. Dimension sichtbar. Längere Äquilibrierung hatte Proteinverlust und eine Vergrößerung der Proteinflecken durch Diffusion zur Folge.

2.2 SDS-PAGE - 2. Dimension

a) Einfluß der Agarose und des ß-Mercaptoäthanols

Um einen gleichmäßigen Übergang der Proteine zu gewährleisten müssen beide Gele mit einer 1 % Agaroselösung miteinander verbunden werden. Dabei ist der pH (=6,8) der Agarose-Lösung identisch mit dem des Sammelgels, um Veränderungen des Ionengradienten (nötig zur Konzentrierung der Proteine) zu vermeiden. Wir haben den Einfluß zweier Faktoren auf die Elektropherogramme geprüft:

1) Agarosepräparate mit verschiedenen Elektroendosmosewerten:
   Agarose L: Mr: -0,02 der Firma LKB
   Agarose standard EEO: Mr: - 0,13 von SERVA

2) den Zusatz von ß-Mercaptoäthanol zu der Agarose-Lösung.

Ad 1: Da Agarose selbst bei der Silberfärbemethode angefärbt wird und eine kontinuierliche horizontale Bande im Molekulargewichtsbereich von ca. 55.000 - 65.000 hinterläßt, ist es wünschenswert, daß die Endosmosewerte der Agarose so gering wie möglich sein sollten. Es hat sich gezeigt, daß von den zwei uns zur Verfügung stehenden Agarosepräparaten jene mit dem kleineren Endosmosewert die geringeren Streifungen in dem obengenannten Molekulargewichtsbereich verursachte.

Ad 2: ß-Mercaptoäthanol, welches auf Grund seiner reduzierenden Eigenschaften zur Zerlegung der Proteine in die entsprechenden Untereinheiten verwendet wird, hatte auf die Streifenbildung keinen Einfluß. Hingegen wirkte es sich auf die Fließfähigkeit der ca. 80-90° C warmen Agaroselösung und damit auf deren Verarbeitbarkeit positiv aus.
Die folgende Vorschrift hat sich als zweckmäßig erwiesen und wurde deshalb bei den im Folgenden beschriebenen Arbeiten verwendet:
Die 1 % Agaroselösung (Agarose L von LKB) wurde durch Auflösen der Agarose in einer Lösung bestehend aus: 10 % Glycerin (W/V); 2,3 % SDS (W/V); 77,7 % 0,062 M Tris-HCl Lösung (pH=6,8) hergestellt. Diese wurde eingefroren und bei Gebrauch durch Zusatz einer geringen Menge (1-2 ml) von "sample-buffer" (ß-Mercaptoethanol enthaltend) bei 80-90° C verarbeitet.

b. Sammelgel

Es wurde geprüft, ob die Länge des Sammelgels eine wesentliche Rolle spielt. Die erforderliche Mindestlänge war 10 mm. Eine Länge über 10 mm erbrachte keine Verbesserung in der Qualität der ELPHO-gramme. Um die von der Agarose verursachten Streifungen auszuschalten wurde versucht, die Acrylamidgelzylinder der 1. Dimension direkt d.h. ohne Verwendung von Agarose in das Sammelgel einzugießen. Die Streifung war deutlich geringer, das Aneinanderfügen der beiden Gelarten gelang jedoch nicht immer zufriedenstellend, so daß auf die Verwendung von Agarose nicht verzichtet werden konnte.

c. Trenngel

Zwei Arten von Gelen können für die 2. Dimension benützt werden:

- Gele mit konstantem Vernetzungsgrad
- Gradientengele mit variablem Vernetzungsgrad (sog. Gradientengele)

Gradientengele (siehe 4.1.2) sind grundsätzlich besser geeignet, Proteingemische mit großer Komponentenzahl aufzutrennen. Deshalb wurden für Vorversuche zur Auftrennung von Lymphozytenproteinen Gradientengele verwendet (ohne Abbildung).
Die Anzahl der Proteine ist im Liquor deutlich geringer. Es kann angenommen werden, daß maximal 145-150 Proteine mit Hilfe der von uns verwendeten Silberfärbemethode in Liquorproben sichtbar gemacht werden können. Da wir Trenngele mit einer Lauflänge von 95 mm verwendeten, ist die Flächenverteilung bei einem konstanten Vernetzungsgrad ausreichend (9). Folglich verwendeten wir 10 %-ige Polyacrylamidgele mit konstantem Vernetzungsgrad zur Herstellung der ELPHO-gramme.

d. Spannung-Stromstärke-Zeit

Die Gele der 2. Dimension wurden im Unterschied zur 1. Dimension bei konstanter Stromstärke (20 mA/Gel) und variabler Spannung (Beginn ca. 75 V - Ende ca. 220 V) gehalten. Die Dauer für die 2. Dimension lag bei 3 bis 3 1/2 Std. Nachdem die durch die Bromphenolblaulinie angezeigte Front aus dem Gel auszutreten begann, wurde die Elektrophorese 1/4 Std. länger durchgeführt.

Dadurch wurden die Fraktionen vom Molekulargewicht 10.000 -14.000 mit den niedermolekularen Haptoglobinuntereinheiten und Präalbumin ausgeschieden zugunsten einer besseren Auftrennung der höhermolekularen Proteine.

2.3 Die Silberfärbemethode

Der besondere Vorteil der Silberfärbung der in der wesentlich höheren Empfindlichkeit (ca. 0,5 ng noch nachweisbare Proteinmenge) liegt, wird gegenüber der einfacheren Coomassie-Färbung nur selten genutzt. Der Verlust an Attraktivität ist in den vielen diffizilen Schritten, bei denen die Reaktionsparameter genauestens eingehalten werden müssen, begründet. Dabei ist das Einhalten der Zeiten bei den Schritten C 5.3 bis C 5.7 wichtiger als die genaue Konzentration der Lösungen. Diese beiden Schritte, das Imprägnieren mit Natriumthiosulfat und das Silberimprägnieren mit anschließendem Waschvorgang, sind von wesentlicher Bedeutung für das Gelingen der Silberfärbung. Die Farbe der Proteinflecken ist von der Proteinmenge und der Temperatur während und nach dem Entwicklungsschritt mit Natriumcarbonat abhängig. Größere Proteinmengen wie auch höhere Temperaturen führen zu rot-bräunlichen Farbtönen während beim Arbeiten mit Eiszusatz braun-schwarze Farbtöne das Bild kennzeichnen.

D 3. Veränderungen der Proteinzusammensetzung im Liquor cerebrospinalis von schizophrenen Patienten

Von verschiedenen Autoren (20,26) wurden in der letzten Zeit Veränderungen in der Proteinzusammensetzung des Liquor cerebrospinalis bei psychiatrischen Patienten berichtet. Angeregt durch diese Berichte, wurden Proben von Liquores, die innerhalb eines 4-monatigen Zeitraums (von November 85 bis Februar 86) zu Routineuntersuchung (Albumin, IgG-Bestimmung, serologische Nachweise) in das serologische Labor gesandt wurden, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht.

Da jedoch nicht alle psychiatrischen Patienten routinemäßig punktiert werden, sind die untersuchten Proben selektioniert für Fälle, bei denen ein Verdacht auf organische Veränderungen bestand. Die Liquores wurden auf qualitative Veränderungen in der Proteinzusammensetzung untersucht, da uns Möglichkeiten der quantitativen Differenzierung (z.B. durch optisches Abtasten der Proteinflecken mit einem computergesteuerten Mikrodensitometer) nicht zur Verfügung standen.

Abb. 2 : Elektrophoretische Auftrennung der Liquor cerebrospinalis-Proteine eines Kontrollpatienten. Die aufgetragene Proteinmenge war 15 ug. Isoelektrisches Fokusierung von pH 3,5 - 10, Akrylamidgehalt des Plattengels der 2. Dimension (von oben nach unten). 10 %; Nachweis der Proteine durch Silberfärbung.

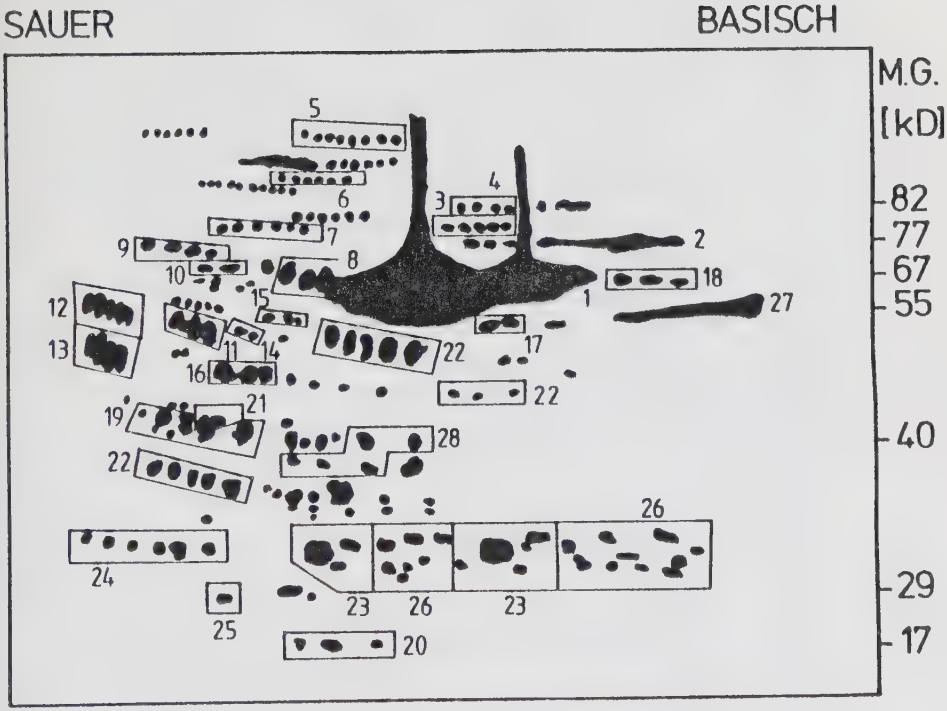

Abb. 3: Schematisch dargestelltes Elektropherogramm des Liquor cerebrospinalis (Zuordnung der Proteinflecken siehe nächste Seite)

1 = Albumin
2 = Transferrin
3 = C_3-aktivator
4 = Plasminosen
5 = α_2-Makroglobulin
6 = Coeruloplasmin
7 = Glykoprotein
8 = Hemopexin
9 = Prothrombin
10 = α_1 B Gloykoprotein
11 = α_1-Antitrypsin
12 = α_2-Antichymotrypsin
13 = α_2 HS-Glykoprotein
14 = Gc-Globulin
15 = Antithrombin III
16 = α } Fibrinogen
17 = β } Fibrinogen
18 = γ } Fibrinogen
19 = β-Haptoglobin
20 = α-Haptoglobin
21 = Aktin
22 = Liquorspezifische Proteine
23 = Ig leichte Ketten (κ/λ)
24 = IgI
25 = Apo-A-I Lipoprotein HOL
26 = "oligoklonale Banden"
27 = γ -Kette des IgG
28 = zusätzlich auftretende Proteingruppe

Eine typische Auftrennung der Liquorproteine mittels zweidimensionaler Elektrophorese ist in Abb. 2 zu sehen. Die Identifizierung der einzelnen Proteine wurde erleichtert durch die Tatsache, daß die Proteinzusammensetzung des Liquors weitgehend der des Serums entspricht. Die im Vergleich zu den anderen Proteinen ziemlich große Menge des Albumins (Abb. 3) beeinflußt das elektrophoretische Verhalten der Proteine, besonders im Molekulargewichtsbereich von 60.000 - 70.000. Weiterhin muß erwähnt werden, daß durch die Elektrophoresebedingungen (SDS, Harnstoff, ß-Mercaptoäthanol) die Proteine in ihre Untereinheiten aufgetrennt werden.
So sind die leichten (κ- und λ-) Ketten der Immunglobuline nahe der Front zu finden (Abb. 2 und 3), die schweren Ketten im selben Molekulargewichtsbereich wie das Albumin, jedoch im basischen Bereich der IEF-Auftrennung.

Abb. 4: Elektrophoretische Auftrennung der Liquor cerebrospinalis-Proteine eines Patienten mit schizophrener Psychose.
Aufgetragene Proteinmenge: 15 ug
IEF von pH 3,5 - 10
SDS-PAGE: 10 % Akrylamid
Nachweismethode: Silberfärbung
Die Pfeile bezeichnen zusätzlich auftretende Proteine.

Veränderungen der Proteinzusammensetzung in qualitativer Hinsicht wurden bei 41 % (n = 17) der Schizophrenen festgestellt und zwar das Auftreten von zwei zusätzlichen Proteinen.

Diese zwei Proteine erschienen immer gemeinsam, haben ein Molekulargewicht von ca. 40.000 und isoelektrische Punkte (im Harnstoff) von ca. 5,8 und 6,4. Sie konnten nicht nachgewiesen werden im Liquor von 10 internistischen und chirurgischen Kontrollprobanden.
Auch im Serum der Patienten waren diese Proteine offenbar nicht vorhanden. Das Auftreten eines dritten Proteins im Molekulargewichtsbereich von etwa 30.000 Dalten konnte bei manchen Patienten beobachtet werden (Abb. 4). Dieses Protein war allerdings unabhängig von den zwei oben beschriebenen und konnte keinem Krankheitsbild zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein polymorph auftretendes, von einer Krankheit unabhängiges Protein.

Eine Analyse bzw. Identifizierung lag nicht im Rahmen der Möglichkeiten dieser Arbeit. Da diese Proteine jedoch identisch mit zwei von einer amerikanischen Gruppe gefundenen Proteinen zu sein scheinen (20), soll im Folgenden kurz auf die Bemühungen dieser Gruppe eingegangen werden, diese Proteine zu identifizieren:
Um zu sehen ob es sich um Immunglobuline handelt, wurden von dieser Gruppe (20) eine Immunreaktion mit Antikörpern gegen leichte und schwere Immunglobulinketten durchgeführt. Die Proteine reagierten nicht mit den Antikörpern.
Die Frage, ob diese Proteine durch chemische Veränderungen aus bereits im Liquor cerebrospinalis vorhandenen Proteinen entstehen, wurde durch Inkubation von

unkonzentriertem Liquor für 3 Monate bei 20° C und durch Glykosylieren, Carbamylieren bzw. Proteolyse der CSF-Proteine zu beantworten versucht. Keine der Kontrollproben zeigte nach chemischer Modifizierung Punkte, die den beiden Proteinen entsprachen (20).

Es ist daher anzunehmen, daß die Proteine krankheitsbezogene Komponenten darstellen und daß ein pathophysiologischen Entstehungsmechanismus der Proteine vorliegt.

Die Tatsache, daß in einer amerikanischen Studie (26) mit 99 gesunden Kontrollen die Proteine nicht nachgewiesen wurden, sowie das Fehlen dieser Proteine im Serum von Patienten, bei denen sie im Liquor nachgewiesen wurden, deutet auf ihre Entstehung innerhalb des ZNS.

D 4. Ergebnisse aus den Versuchen

29 Patientenliquores, unter denen zwei mit depressivem Syndrom und 10 ohne neurologischen oder psychiatrischen Befund waren, wurden untersucht.
Die Gruppe der 17 schizophrenen Patienten setzte sich wie folgt zusammen:

- 8 weibliche Patienten: Durchschnittsalter 29,5 Jahre; durchschnittliches Gesamteiweiß 32,6 mg %
- 9 männliche Patienten: Durchschnittsalter 27,4 Jahre; durchschnittliches Gesamteiweiß 38 mg %.

Die Diagnosen für diese Gruppe nach ICD Nr. als auch die medikamentöse Therapie sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

VERTEILUNG DER PROTEINE 127/128 AUF DAS UNTERSUCHTE PATIENTENGUT

Pat. Nr.	Alter	Geschlecht	Gesamt Eiweiß	Diagnose	ICD Nr.	Medikation	Proteine 127/128
1	22	männl.	28,8	verschrobene Hebephrenie	295.1	CGP 13442 A 4 mg	+
2	28	weibl.	47,1	Ersterkrank: akute schizophr. Episode mit kataton. hyperkin. Symptomatik	295.4	Haldol, Akineton, Atosil	+
3	26	männl.	32,2	Hebephrenie sek-Alkoholabusus	295.1	Haldol, Neurocil, Imap	+
4	55	weibl.	22,3	akute paranoide Reaktion	295.3	Taxilan	+
5	20	weibl.	40,3	Katatonie	295.2		-
6	22	männl.	45,7	Hebephrenie	295.1	Haldol	-
7	39	männl.	32,5	Paranoid halluz. Schizophrenie	295.3	Haldol, Cyatyl	+
8	37	männl.	54,0	Paranoid halluz. Schizophrenie	295.3		+
9	20	weibl.	38,9	Katatonie	295.2	Haldol, Akineton	-
10	40	männl.	28,0	Cyclothymie evtl.	296.5	Haldol, Lithium, Neurocil	+
11	44	weibl.	42,8	depr. Entwicklung, depr. Syndrom	296.1	Noveril Infusion, Anafranil	+
12	29	weibl.	25,1	Paranoid halluz. Schizophrenie	295.3	Haldol	-
13	32	weibl.	36,0	Hebephrenie	295.1	Imap, Akineton	+
14	24	weibl.	26,7	Hebephrenie ?	295.1		-
15	28	weibl.	24,8	chron. Schizophrenie	295.6	Haldol, Akineton	-
16	19	männl.	28,2	Hebephrenie	295.1	Akineton, Testsubst. CGP 19486	-
17	29	männl.	50,6	Paranoid halluz. Schizophrenie	295.3	Neurocil, Testsubst. CGP 19486	-
18	24	männl.	38,9	Hebephrenie, Katatoner Typ	295.1 od. 295.2	Fluanxol, Akineton	-
19	28	männl.	31,6	Hebephrenie katatoner Typ	295.1 od. 295.2	Haldol, Atosil	-

Von den 17 Patientenliquores mit schizophrener Diagnose waren bei 7 die zwei Proteine vorhanden, was einem Prozentsatz von 41 % entspricht. Von den 7 Patienten mit den Proteinen gehören an:

- 3 Patienten dem hebephrenen Typ ICD=295.1
- 3 Patienten dem paranoid-halluzinatorischen Typ ICD=295.3
- 1 Patient mit akut schizophrener Episode mit katatonen Symptomen ICD=295.4

Diese Verteilung könnte bedeuten, daß das Auftreten dieser Proteine nicht spezifisch einer der Schizophrenieuntergruppen zugeordnet werden kann, obwohl die Fallzahl noch viel zu gering für eine solche Interpretation der Ergebnisse ist.

Bei zwei Patienten mit der klinischen Diagnose: Cyclothymie und depressives Syndrom (Pat. 10, 11) sind die Proteine ebenfalls vorhanden. Von Harrington und Mitarbeitern (20) wurden diese Proteine auch im Liquor von Kranken mit Multipler Sklerose, Jacob Creutzfeld und Encephalitis nachgewiesen.
Diese und die in Tabelle 1 zusammengestellten Befunde lassen demnach keine Spezifität der Proteine erkennen. Es scheint sich um Proteine zu handeln die bei bestimmten entzündlichen Prozessen im ZNS freigesetzt werden und dann im Liquor cerebrospinalis auftreten.

Die 10 Kontrollprobanden (3 weibl. und 7 männliche Patienten) welche nicht aus einem gesunden Kollektiv, sondern von Patienten aus anderen Krankenhausabteilungen ausgewählt wurden und bei denen keine bestehenden oder vergangenen neurologischen oder psychischen Erkrankungen bekannt waren, haben einen durchschnitt-

lichen Gesamteiweißgehalt von 29,7 mg %. Es konnten bei keinem die Proteine nachgewiesen werden.
Auch die Gabe von Medikamenten scheint keinen Einfluß auf das Auftreten der Proteine zu haben (Tabelle 1). Die für die einzelnen Patienten verwendeten Medikamente gehören verschiedenen Substanzklassen an. Die zusätzlich auftretenden Proteine konnten keiner speziellen Substanzklasse zugeordnet werden. Eine Bestätigung dieser Annahme kann jedoch nur die Analyse von Liquores unbehandelter Patienten liefern, die uns jedoch nicht vorlagen.

Bei den hier untersuchten Patienten kann zwar der absolute Wert des durchschnittlichen Gesamteiweißes nicht als erhöht bezeichnet werden, wohl aber im Vergleich mit dem der Kontrollprobandengruppe.
Bei einigen Patienten mit schizophrener Diagnose kann vom Erscheinen zusätzlicher leichter Ketten - vergleichbar mit der multiplen Sklerose - gesprochen werden (Abb. 5). Dabei handelt es sich um dieselben Patienten, die auch die beiden zusätzlichen Proteine aufwiesen. Für eine Auswertung und weitergehende Interpretation sind die in dieser Arbeit analysierten Fälle jedoch zu wenig.

Ein interessantes Bild liefert ein Elektropherogramm, welches von einem an AIDS erkrankten Patienten gemacht wurde (Abb. 6). Das bemerkenswerte daran war, die erhöhte Immunglobulinmenge und ein erhöhter Haptoglobingehalt. Fast vollständig fehlte eine Gruppe von Glykoproteine (siehe Pfeile). Nicht vorhanden waren die beiden oben beschriebenen zusätzlichen Proteine.
Eine Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch noch nicht möglich.

Abb. 5: Elektrophoretische Auftrennung der Liquor-cerebrospinalis-Proteine eines Patienten mit schizophrener Psychose.
Bedingungen: siehe Abb. 4
Im Bereich der leichten Ketten des IgG (unterer Bildrand) sind zusätzliche Proteinflecke zu erkennen (Pfeile).

Abb. 6: Elektrophoretische Auftrennung der Liquor-cerebrospinalis-Proteine eines Patienten mit AIDS (aquired immune deficiency syndrome)
aufgetragene Proteinmenge: 15 ug
IEF: pH 3,5 - 10
SDS-PASE: 10 % Acrylamid
Nachweis: Silberfärbung
die Pfeile bezeichnen die im Text erwähnten Veränderungen.

D 5. Zusammenfassung

Die Methode der zweidimensionalen Elektrophorese in Verbindung mit der Silberfärbung zeichnet sich durch höchste Empfindlichkeit für die Auftrennung komplexer Proteingemische aus.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Erarbeitung dieser Methode für die Analyse der Proteine des Liquor cerebrospinalis von psychiatrischen Patienten.
In Vorversuchen wurden die Bedingungen für eine optimale Proteinauftrennung (Einfluß von Stromstärke, Spannung, Reagenzien etc.) untersucht.

Bei Verwendung dieser Methode zur Analyse des Liquors von 17 schizophrenen Patienten wurden bei 7 Patienten zwei neue Proteine nachgewiesen. Dies entspricht einem Prozentsatz von 41 % gegen über 32 % in einer amerikanischen Studie.

Da diese Proteine auch bei Patienten mit anderen psychiatrischen Erkrankungen (2 mit affektiven Psychosen), sowie bei anderen Krankheiten (multiple Sklerose, Encephalitis) gefunden wurden, scheinen sie nicht schizophreniespezifisch zu sein.

Das Auftreten der Proteine war nicht auf Subtypen beschränkt und war nicht beeinflußt durch die Medikation.

Gleichzeitig konnte bei diesen schizophrenen Patienten eine Tendenz zum vermehrten Auftreten von Komponenten der Immunglobuline festgestellt werden.

E. Literaturverzeichnis

1. Schulte-Tölle: Psychiatrie; Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, New York, 1979

2. Einstein E.R.: Proteins of the Brain and CSF in Health and Disease. pp. 93-172, Charles C. Thomas. Springfield Illinois (1982)

3. Wood J.H.: Neurobiology of Cerebrospinal Fluid. Vol. 2 Plenum Publishing Corporation. New York. (1980)

4. Bruetsch W.L., Bahr M.A. et al: The group of dementia praecox patients with an increase of the protein content of the cerebrospinal fluid. J. Nerv. Ment. Dis. 95: 669-679 (1942)

5. Denker S.J., Malm V.: Protein pattern of cerebrospinal fluid in mental disease. Acta Psychiat. scand. (Suppl) 203: 105-109 (1968)

6. Hunter R., Jones M., Malleson A.: Abnormal cerebrospinal fluid total protein and gammaglobulin levels in 256 patients admitted to a psychiatric unit. J. Neurol. Sci. 9: 11-38 (1969)

7. De Lisi L.E., Weinberger D.R., Potkin S., et al. Quantitative determination of immunoglobulins in CSF and plasma of chronic schizophrenic patients. Br. J. Psychiatry 139: 513-518 (1981)

8. Bock E.: Immunoglobulins, prealbumin, transferrin, albumin and alpha 2- macroglobulin in cerebrospinal fluid and serum in schizophrenic patients. Birth Defects 14:283-295 (1978)

9. Torrey E.F., Yolken R.H., Winfrey C.J.: Cytomegalovirus antibody in cerebrospinal fluid of schizophrenic patients detected by enzyme immunoassay. Science 216: 892-894 (1982)

10. Kaufmann C.A., Weinberger D.R.: Viruses and schizophrenia. Lancet: 1136-1137 (1983)

11. Pearson E.K.: Study of cerebrospinal fluid in schizophrenics - A review of the literature. Psychopharmacol. Bull. 9: 59-62 (1973)

12. Bock E., Rafaelsen O.J.: Schizophrenia: Proteins in blood and cerebrospinal fluid. Dan. Med. Bull. 21: 93-105 (1974)

13. Van Kammen D.P., Sternberg D.E. (1980): Cerebrospinal fluid studies in schizophrenia. In Wood J.H. (ed) Neurobiology of cerebrospinal fluid. New York: Plenum pp 719-739

14. Darrell G. Kirch, Charles A. Kaufmann, et al.: Abnormal cerebrospinal fluid protein indices in schizophrenia. Biol. Psychiatry 20: 1039-1046 (1985)

15. O'Farrell P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250; 4007-4021 (1975)

16. Merril C.R., Goldmann D., Sedman S.A. and Ebert M.H.: Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins. science 211: 1437-1438 (1981)

17. Oakley B.R., Kirsch D.R. and Morris N.R.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 105, 361-363 (1980)

18. Walsh M.J., Limos L., et al.: Two-Dimensional elektrophoresis of cerebrospinal fluid and ventricular fluid proteins and comparison with serum; J. Neurochem. 43, 1277-1285 (1984)

19. Harrington M.G., Merril C.R., Goldmann et al: Two-dimensional elektrophoresis of cerebrospinal fluid proteins in multiple sclerosis and various neurological diseases. Elektrophoresis 5, 236-245 (1984)

20. Harrington M.G., Merril C.R., Fuller Torrey E.: Differences in cerebrospinal fluid proteins between patients with schizophrenia and normal Persons. Clin. Chem. 31., 722-726 (1985)

21. Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4:Nature 227, 680-685 (1970)

22. Weber R., Osborn M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-poliacrylamide Gel elektrophoresis; J. Biol. Chemi. 244. 16, 4406-4412 (1969)

23. Ornstein L.: Ann. NY. Acad. Sci. 121, 321 (1964)

24. Davis B.J.: Ann. NY. Acad. Sci. 121, 404 (1964)

25. Studier F.W.: Analysis of Bacteriophage T7 early RNAS and Proteins on slab Gels. J. Mol. Biol. 79, 237-248, (1973)

26. Harrington M.G., Merril C.R.: Additional cerebrospinal fluid proteins found in schizophrenia and Creutzfeld-Jakob disease. Psychopharmacology Bulletin 21, 361-364 (1985)

27. Rieder H.P.: Cu-Folin Methode zur Bestimmung des Totalproteins im Liquor cerebrospinalis. Klin. Wschr. 4479, (1966)

28. Leigh Anderson and Norman G.Anderson: High resolution two-dimensional eletrophoresis of hiuman plasma proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 74, 5421-5425 (1977)

29. Wildenauer D.B., Hoechtlen W., v. Hoch K.H., Ackenheil M.: changes in the CSF-Protein pattern of psychiatric patients as detected by two-dimensional polyacrylamide-Gel-elektrophoresis and silver staining 3. Jahreskongress der Arbeitsgemeinschaft Europäischer Psychiater, 23. - 25. Okt. 1986, Strasbourg, Abstract

Die Versuche zur vorliegenden Arbeit wurden in der Neurochemischen Abteilung der Psychiatrischen Klinik der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. M. Ackenheil danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und sein reges Interesse an der Arbeit, Herrn Dr. D. B. Wildenauer und dessen Mitarbeitern für Rat und Hilfe bei den Versuchen.

F. LEBENSLAUF

Am 24.01.1940 wurde ich, Karl-Heinz v. Hoch als Sohn des Dipl. Kaufmannes Adalbert v. Hoch und seiner Ehefrau Berta v. Hoch in Temeschburg/Rumänien geboren.

Von 1946 - 1950 besuchte ich die Volksschule und anschließend das Nikolaus-Lenau Lyzeum in Temeschburg, an welchem ich 1956 die Reifeprüfung ablegte.
Vom Wintersemester 1956 bis Sommersemester 1961 studierte ich am Polytechnischen Institut Temeschburg Industrielle Chemie und schloß im Juli 1961 mit dem Staatsexamen zum Dipl. Ing. Fachrichtung organische Industrie dieses ab.

Meine Auswanderung in die Bundesrepublik Deutschland erfolgte am 12.01.1976.
Von 1961 bis 1979 arbeitete ich in meinem Fachgebiet.
Beginnend mit dem Wintersemester 1979 bis Sommersemester 1984 studierte ich Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilian Universität München. Mit dem Staatsexamen am 14.08.1984 schloß ich das Studium ab. Die Approbation als Zahnarzt erhielt ich am 14.09.1984. Vom 15.09.84 arbeitete ich als Assistenzzahnarzt in freier Praxis.
Vom November 1985 bis Februar 1986 arbeitete ich am experimentellen Teil meiner Doktorarbeit bei der neurochemischen Abteilung der psychiatrischen Klinik der Universität München.